

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05596

研究課題名(和文) 一次繊毛関連因子により構築される細胞周期監視システムの新展開

研究課題名(英文) Novel cell cycle monitoring system constructed by primary cilia-related factors

研究代表者

千葉 秀平 (Chiba, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60572493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は分裂期では紡錘体の極、休止期では一次繊毛の土台である基底小体として細胞周期の各段階に応じて柔軟に機能を変化させる。細胞周期と同調した中心体の機能変化がいかなる分子システムによって担われているのかは不明な点が多く残っている。本研究は中心体機能ドメインの構築機序と分子間相互作用機構の一端を明らかにした。当該研究期間内に基底小体に局在する一次繊毛の形成ならびにその関連因子が、様々な局面で細胞周期進行を調節することを見出した。さらに核膜崩壊を伴わない中心体構造変換系を用いて、今まで直接的な関与が報告されていなかった細胞周期制御因子が中心体構造変換そのものを制御する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中心体構造変換を担う分子基盤の全貌の解明から、細胞が備えたりスク管理システムを明らかにしようとする点が本研究の特色である。本研究により、細胞が兼ね備えた新たな細胞周期監視システムの実体が明らかになる可能性があり、ここで得られた成果は細胞周期制御の理解に向けた新機軸の提唱ならびに繊毛症の発症メカニズム解明にむけた新展開へと派生することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The centrosome acts as a microtubule-organizing center at interphase phases; it can mature into a spindle pole during mitosis and transition into a cilium by elongating microtubules from the basal body on cell differentiation or cell cycle arrest. In this study, I identified hierarchical organization of the Subdistal appendages, which play a role for the stability of centrosomal microtubules. I also found that the basal body and primary cilia-related factors regulate various aspects of cell cycle progression. Furthermore, I found that cell cycle regulators, which direct involvement has not been reported so far, may regulate structural transformation of centrosome.

研究分野：細胞生物学

キーワード：基底小体 繊毛 細胞周期 中心体構造変換 超解像イメージング appendage チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物細胞の大半が細胞増殖を休止させる条件で、細胞表面に一本の非運動性繊毛（一次繊毛）を形成する。一次繊毛は、構造を取り囲む繊毛膜上に受容体やイオンチャネルを高密度に配することで、細胞外の液性因子や機械的・化学的刺激を受容する（図1）。その構築・機能の不全は発生期の形態異常、嚢胞性腎疾患、不妊、網膜変性などを複合的に呈する遺伝性疾患（繊毛症）の発症と密接に関連するため、一次繊毛の構築を担う分子基盤の理解は医学的に重要な研究命題であるといえる。

一次繊毛の構築は細胞周期と密接に関連する（図1）。これは一次繊毛の土台となる基底小体が中心体由来することに起因する。細胞が血清飢餓や細胞接触により G1 期から G0 期に移行すると、中心体を構成する2つの中心小体（娘、母中心小体）のうち、DA (Distal appendages)をもつ母中心小体の遠位部からは、キャッピング因子 CP110 が離脱する（母中心小体-基底小体変換）。これをきっかけに基底小体から軸系が伸長し、一次繊毛が形成される。DA は一次繊毛形成の際に、基底小体が細胞膜にドッキングする際に必要だが有糸分裂期（M 期）の核膜崩壊直後には娘中心小体上に新生される（娘-母中心小体変換）。このことから、一次繊毛を形成する準備は少なくともこの時期には始まっているといえる。一方、細胞が増殖相に再入すると一次繊毛は速やかに退縮し、基底小体は細胞膜から解離した後、中心体として紡錘体形成する。このように、“娘-母中心小体変換”と“母中心小体-基底小体変換”をはじめとする中心体の機能・構造の変換は細胞周期依存的であるが、中心体の構造変換を細胞周期と連動させる機構の詳細は未だに不明である。

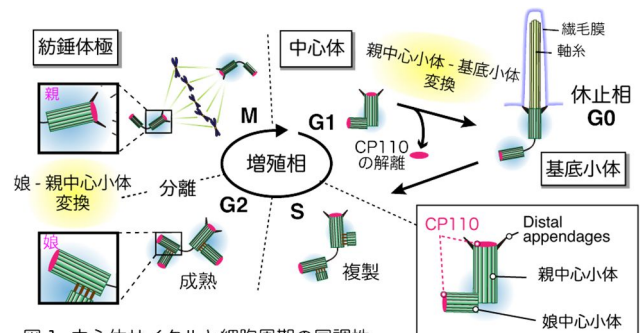


図1. 中心体サイクルと細胞周期の同調性

細胞が休止期へと移行すると親中心小体 - 基底小体変換により一次繊毛が形成される [CP110(赤)の解離]。増殖相への移行により、一次繊毛は速やかに退縮し、中心体はS期での複製後、分裂期には紡錘体極として働く。核膜崩壊後、娘中心小体にはDAPsが新生される（娘-親中心小体変換）。一次繊毛の形成には2段階の中心体変換機構が必要となる。

2. 研究の目的

中心体は分裂期に紡錘体極、休止期は基底小体として細胞周期の各段階に応じて柔軟に機能を変化させる。しかし、細胞周期と同調した中心体の機能・構造変化をいかなる分子システムが担っているのかは詳細が不明である。近年、中心体が細胞周期進行を監視、制御するという新規概念が提唱され始めている。本研究では中心体関連因子とそれを基本構成要素とする一次繊毛による直接的な細胞周期の進行制御機構の実体解析を行い、中心体・一次繊毛関連因子を起点とする細胞周期の制御機構を明らかにすることを目指した。さらに本研究は基底小体に局在する一次繊毛の形成因子が意外なことに増殖相進行中には核内でDNA損傷応答に関わる可能性を見出したことに起因し、この“非繊毛機能”と“中心体構造変換”の二役を一手に担う蛋白質群の発見に基づいて、細胞周期と密接な同調性をもつ中心体機能変換の分子基盤を世界に先駆けて明示することを目的とする。本研究の進展により、核と中心体を舞台とした巧妙な細胞周期監視システムの存在が明らかになることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 中心体機能ドメインメインの構築機序と分子間相互作用機構の解明: 本研究が主旨とする中心体関連因子による細胞周期制御のシグナル発信機構を特定するには、中心小体/基底小体の各機能ドメインの分子基盤を明確にし、その構築機序や分子間相互作用関係の理解を進める必要がある。本課題では、発現抑制実験と超解像顕微鏡による統合的解析から、DA、subdistal appendages (SDA)、移行帯 (Tz)を始めとする中心体上機能ドメインについて構築機

序と構成分子間の相互作用ネットワークの実体解析を行った。

(2) 中心体構造ならびに一次繊毛の構造・機能異常と細胞周期進行の関連の解析

当該研究期間中に既知の各種オミクスデータの統合的解釈により SDA の構成因子 (SAPs: Subdistal appendage proteins) として見出した Cep128 は、その発現抑制によりヒト網膜色素上皮細胞株 (hTERT-RPE1 細胞) で SAP の構築異常を呈し、血清存在条件において G0 期への移行促進による一次繊毛形成の亢進が見られた。これに基づき、本課題では siRNA を用いた SAPs の欠損と細胞周期進行異常の関連について解析を行った。

PI(3,4,5)P3、PI(4,5)P2 のイノシトール環の 5 位を脱リン酸化することで PI(3,4)P2 または PI(4)P を産生する繊毛膜局在タンパク質であるホスファチジルイノシトールリン酸-5-脱リン酸化酵素 (INPP5E) を欠損する遺伝子改変マウスの初期胚由来線維芽細胞の一次繊毛は、繊毛先端から高頻度で小胞 [繊毛由来小胞: Ciliary extracellular vesicle (Ciliary-EV)] を放出する。本課題では Ciliary-EV 放出と細胞周期進行の関わりを解析した。

(3) 中心体関連因子の核内での機能の解析: DAPs である TTBK2 と Cep164 は細胞周期を通して親中心小体の DAPs に局在したが、意外なことに、間期の細胞の一部では、ごく稀に (5%未満)、両者が核内で foci 状の集積を呈するところを見出した。このような局在を呈する細胞は決まって空間的に分離した 2 つの中心体 (4 つ中心小体) を保持していた。一般に増殖相では G2 期と M 期の細胞がこのような中心体配置を呈するが (図 1)、対象細胞が核膜崩壊を伴わないことをふまえると G2 期の細胞群に特徴的な染色像であると判断された。そこで Roscovitin の処理による G2/M チェックポイントを活性化がこれらの中心体関連因子の活性並びに細胞内局在に与える影響について解析を行い、細胞周期進行制御における役割を解析した。

(4) 核膜崩壊を伴わない中心体構造変換系による細胞周期関連因子の中心体変換機能解明
ATR や p27, Cyclin-Cdk, Plk1 といった細胞周期関連因子の多くが中心体に局在することが知られるが、その機能抑制は各種細胞周期チェックポイントの活性化に伴う増殖阻害や分裂期紡錘体構築の異常による分裂異常や細胞死を亢進させるため、その "真の中心体構造変換機能" を明らかにするのは困難である。本課題は発生過程で娘-親中心小体変換ならびに親中心小体-基底小体変換という 2 段階の中心体変換が核膜崩壊を伴わずに連続的に起こるマウス気管上皮の初代培養細胞系 (mTec) を用い、紡錘体構築やその失敗に基づく細胞周期進行の停止や細胞死と独立して中心体構造変換への影響を解析した。実験では、マウス気管上皮細胞の多繊毛細胞へ誘導をする際に、各種細胞周期因子に対する阻害剤を加え、中心体の複製、親中心小体-基底小体変換ならびに繊毛形成への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 中心体機能ドメインメインの構築機序と分子間相互作用機構の解明

中心体は回折限界に迫る約 200nm×500nm のごく微小なオルガネラであるため、一般的な光学顕微鏡の空間分解能 (約 200nm) では中心小体/基底小体上で機能する分子群の詳細な空間配置を明らかにするのは困難である。本研究では親中心小体の付属構造体の構築に関わる因子群の空間配置について構造化照明顕微鏡 (SIM) を用いて解析した。SDA は多数の構成分子からなる巨大タンパク質複合体で、Distal appendages (DAPs) や Tz と同様に各種構成因子が中心を起点に入れ子状かつ放射状に積み重なったドーナツ状構造からなることが予想

された。6つの既知SAPsであるOdf2, Cep128, centriolin, Ndel1, Ninein, Cep170について、対象のcDNAをクローニング後、そのN末端、C末端にGFPを融合し、細胞内に発現させたところ、各SAPは親中心小体上で固有の径を持つリング状の局在パターンを呈した(図2)。次に、SDAの構築機序を明らかにすべく、各SAPsをsiRNAにより発現抑制し、対象因子のノックダウン(KD)により、その他のSAPsのSDAsへの局在が影響を受けるか検証した(図2)。この結果、もっともリング径が小さいOdf2のKDにより、すべてSDAs分子のSDA局在が失われた(図3)。逆に、どのSAPsの発現抑制によってもOdf2のSDAへの局在は影響を受けなかった。一連の解析の結果、SDAは最も中心(近位側)に配置したODF2を階層上位としてCep128-Ndel1, Centriolin, Ninein-Cep170の順で外側(遠位側)に積み重なるように構築されることが判明した。

本研究ではさらに京都大学中山和久教授、加藤洋平講師らと共同で、試料物理的超解像度技術である拡大顕微鏡法(Expansion Microscopy:ExM)によるDistal appendages(DAs)とTzの構成因子の空間配置解析を進めており、今後の解析によりこれらの機能ドメインを構成する詳細な分子基盤とその分子間相互作用関係への理解が広がることが期待される。

(2) 中心体構造ならびに一次繊毛の構造・機能異常と細胞周期進行の関連の解析

細胞周期進行はCdk-Cyclin複合体とCdk阻害因子に制御される。SAP因子として同定したCep128の発現抑制細胞(KD)ではSDAの全欠損のほか、G0期への移行促進による一次繊毛形成の亢進、Cdk阻害因子p27の核蓄積の増加がみとめられた。通常、G0/G1期に核内に局在するp27はCdk2依存的なリン酸化によって分解され、S期が進行する。現時点では、SAPの欠損がなぜp27の核蓄積を増加させるのかは不明だが、これまでに免疫沈降法でCep128とCdk2が共沈降すること、Cep128KD細胞ではCdk2の中心体局在が著しく損なわれることを見出した。

一次繊毛構造の全体を取り巻く繊毛膜は一見すると細胞膜から連続した構造体であるが、液性因子の各種受容体やイオンチャネルが高濃度に局在しており、細胞膜とは構成タンパク質、さらには脂質組成の面でも一線を画す。このような構成的特徴によって、細胞は液性因子や機械的・化学的刺激を受容することが可能となるため、一次繊毛は細胞外環境を感知するいわばアンテナとしての役割を担っているといえる。近年、大規模プロテオミクス解析や疾患患者のエクソーム解析により、重度の精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎、眼瞼下垂、小脳虫部欠損、下部脳幹形成異常を呈する常染色体劣性遺伝性疾患

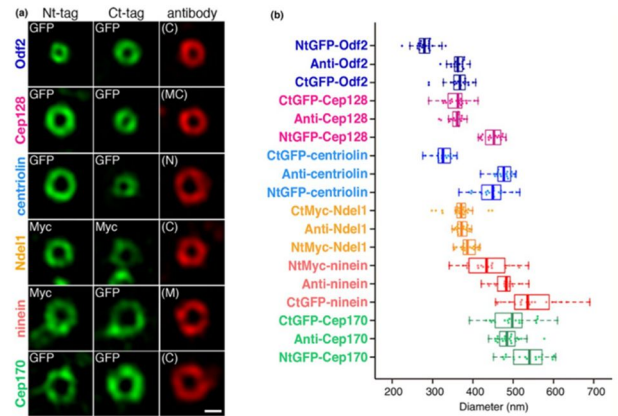


図2: 超解像顕微鏡によるSAPs分子の空間配置解析 (左) N末端(Nt-tag)、C末端(Ct-tag)にタグを融合、または内在性のSAPs分子に特異的な抗体を用いて中心体上の対象分子の空間配置を超解像顕微鏡で観察した。(右) SAPs分子固有のリングサイズの計測。

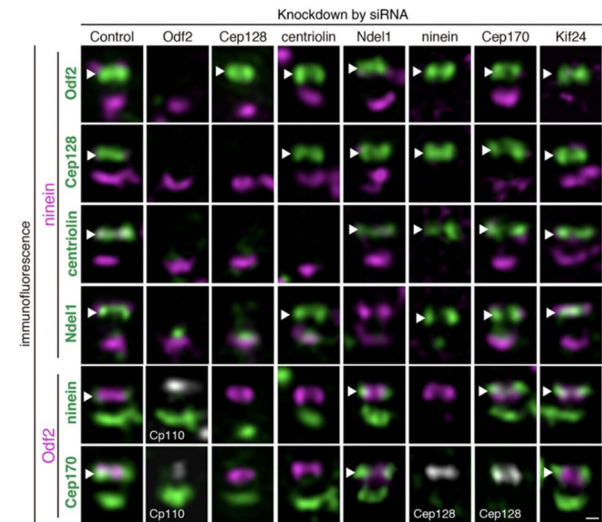


図3. SDAsの構築機序の決定 対象因子のノックダウンによる他のSDAs分子(緑)への局在の影響を示す。矢頭はSDAsの位置を示す。マゼンタは親中心小体のマーカー分子である。スケールバー:100 nm

ジュベール症候群の発症に関わる遺伝子群が多数同定された。その大半は繊毛基部の Tz を構成する因子であり、変異細胞では PI(3,4,5)P3、PI(4,5)P2 のイノシトール環の 5 位を脱リン酸化することで PI(3,4)P2 または PI(4)P を産生することが知られるホスファチジルイノシトールリン酸-5-脱リン酸化酵素 (INPP5E) の繊毛膜局在異常を呈することが知られる。代表者を含む研究班は INPP5E を欠損する遺伝子改変マウスの初期胚由来線維芽細胞の一次繊毛では、繊毛先端から高頻度で Ciliary-EV が放出されることを見出した。血清飢餓条件では、通常、Ciliary ectosome の放出は野生型細胞ではほとんど確認されなかったが、血清添加による増殖刺激依存的に INPP5E は繊毛膜から速やかに離脱し、これにより繊毛膜の PI(4,5)P2 レベルが上昇すると、PIP2 依存性アクチン核化タンパク質の集積、アクチン繊維の重合が相次いで引き起こされ、Ciliary-EV が放出されることを発見した (図 5)。さらに興味深いことに、繊毛内アクチン重合阻害することで Ciliary ectosome の放出が阻害されること、これにより一次繊毛の退縮は著しく遅滞し、細胞周期の休止期(G0)期から増殖層への回帰が顕著に阻害されることが明らかになった。以上の結果から、一次繊毛から特異的に放出される細胞外小胞が繊毛の退縮ならびに休止 (G0)期から細胞周期の増殖サイクルへの移行に必要であることが判明した。本課題は Johns Hopkins 大学の井上尊生教授、広島大学 (成果発表時: 浜松医科大学) の池上浩司教授らの研究班との共同研究である。

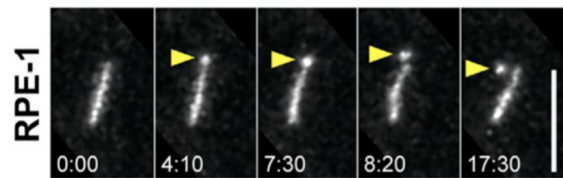


図 4. 血清添加による一次繊毛膜からの小胞の放出の様子
 繊毛膜は Arl13-EGFP により可視化。矢頭は放出された小胞を示す。スケールバー: 10 μm

(3) 中心体関連因子の核内での機能の解析:

Roscovitin の処理に伴い、核内集積する

TTBK2 を持つ細胞の数が顕著に増加(80%以上)することを見出した。すでに TTBK2 の結合タンパク質である Cep164 が DNA 損傷修復酵素の機能発現を担う足場蛋白質として核内で働くことが報告されており、TTBK2 と Cep164 の複合体 (DAPs 複合体) が、中心体変換に加えて、核内では DNA 損傷修復に関わる可能性が示唆された。TTBK2 の一次配列解析に基づく *in silico* 解析から TTBK2 をリン酸化する上流キナーゼの候補因子として DNA 損傷応答に関わる Ser/Thr kinase である ATR(ATM and RAD3-related)に着目し、実際、これまでに ATR は Cep164 に結合した TTBK2 を効率的にリン酸化することを明らかにしている。

(4) 核膜崩壊を伴わない中心体構造変換系による細胞周期関連因子の中心体変換機能解明

一般的な培養細胞では DNA 修復酵素が中心体変換に関与するか検証する場合、分裂への期進行の阻害 (結果、娘-親中心小体変換も阻害される) や細胞死の誘導、紡錘体構築の異常による分裂異常の亢進が障害となり、これらの”真の中心体構造変換機能”を明らかにするのは困難である。そこで、本実験では核膜崩壊を伴わない中心体構造変換系である mTec を用いて、細胞周期制御因子による中心体構造変換機構への関与を解析した。この結果、ATR kinase の特異的な阻害剤である VE-821 の投与では中心小体の複製が顕著に阻害されることが明らかになった。次に、Pik1 の特異的な阻害剤である BI2536 を処理したところ、中心小体の複製と細胞膜へのドッキングに関して影響は見られない一方で、一次繊毛形成は著しく阻害されることが明らかになった。本研究により、今まで直接的な関与が報告されていなかった細胞周期制御因子が中心体構造変換そのものを制御する可能性が初めて示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dateyama Izumi, Sugihara Yoshihiro, Chiba Shuhei, Ota Reo, Nakagawa Risa, Kobayashi Tetsuo, Itoh Hiroshi	4. 巻 132
2. 論文標題 RABL2 positively controls localization of GPCRs in mammalian primary cilia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.224428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kashihara Hiroka, Chiba Shuhei, Kanno Shin ichiro, Suzuki Koya, Yano Tomoki, Tsukita Sachiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Cep128 associates with Odf2 to form the subdistal appendage of the centriole	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 231 ~ 243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1111/gtc.12668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Kengo, Nagai Tomoaki, Chiba Shuhei, Nakayama Keiko, Mizuno Kensaku	4. 巻 131
2. 論文標題 Glucose deprivation induces primary cilium formation through mTORC1 inactivation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 208769 ~ 208769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.208769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Phua SC, Chiba S, Suzuki M, Su E, Roberson EC, Pusapati GV, Setou M, Rohatgi R, Reiter JF, Ikegami K, Inoue T	4. 巻 168
2. 論文標題 Dynamic Remodeling of Membrane Composition Drives Cell Cycle through Primary Cilia Excision.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤洋平、千葉秀平、中山和久
2. 発表標題 膨張顕微鏡法を用いた一次繊毛の超解像イメージング
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柏原宏香、千葉秀平、加藤洋平、菅野新一郎、中山和久、矢野智樹、月田早智子
2. 発表標題 一次繊毛形成と細胞周期を制御する中心体の分子基盤
3. 学会等名 2018年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柏原宏香、千葉秀平、菅野新一郎、月田早智子
2. 発表標題 中心体機能制御インターフェースとしてのアペンデージ構造の分子基盤
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chiba S, Kashihara H, Tsukita S
2. 発表標題 Molecular basis and hierarchical assembly of centriole/basal body appendage in mammalian cells
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 柏原宏香、千葉秀平、菅野新一郎、月田早智子
2. 発表標題 中心体機能制御インターフェースとしてのアベンデージ構造の分子基盤
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 月田早智子, Elisa Herawati, 千葉秀平
2. 発表標題 基底小体アベンデージによる繊毛形成・アピカル細胞骨格制御機構
3. 学会等名 新学術研究領域「シリア・中心体による生体情報フローの制御」第3回領域会議
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Elisa Herawati, Daisuke Taniguchi, Hatsuho Kanoh, Kazuhiro Tateishi, Shuhei Chiba, Yuki Ogura, Tomoki Yano, Atsushi Tamura, Shuji Ishihara, Sachiko Tsukita
2. 発表標題 Coordination of basal body orientation in differentiating multiciliated cells: Mechanism revealed by long-term live imaging.
3. 学会等名 BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第93回日本生化学会大会 合同大会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 千葉秀平	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 141
3. 書名 実験医学 2018年4月号 超解像度技術と一次繊毛解析への応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----